

(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION
EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(19) Organisation Mondiale de la Propriété
Intellectuelle
Bureau international



(43) Date de la publication internationale
25 août 2005 (25.08.2005)

PCT

(10) Numéro de publication internationale
WO 2005/077388 A1

(51) Classification internationale des brevets⁷ :
A61K 35/56

(21) Numéro de la demande internationale :
PCT/FR2005/000344

(22) Date de dépôt international :
14 février 2005 (14.02.2005)

(25) Langue de dépôt : français

(26) Langue de publication : français

(30) Données relatives à la priorité :
0401474 13 février 2004 (13.02.2004) FR

(71) Déposant (pour tous les États désignés sauf US) :
**SOCIETE D'INNOVATION ET DE RECHERCHE
APPLIQUEE SA (SIERA SA)** [FR/FR]; 266, avenue
Daumesnil, F-75012 Paris (FR).

(72) Inventeurs; et

(75) Inventeurs/Déposants (pour US seulement) : **LOPEZ,
Evelyne** [FR/FR]; 23, avenue de la Bourdonnais, F-75007
Paris (FR). **BOURRAT, Xavier** [FR/FR]; 39, rue de Patay,
F-33000 Bordeaux (FR). **ROUSSEAU, Marthe** [FR/FR];
6, rue du Nivernais, F-29200 Brest (FR).

(74) Mandataires : **TEZIER HERMAN, Béatrice** etc.;
Becker et Associés, 25 Rue Louis Le Grand, F-75002 Paris
(FR).

(81) États désignés (sauf indication contraire, pour tout titre de
protection nationale disponible) : AE, AG, AL, AM, AT,
AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO,
CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB,
GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG,
KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG,
MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH,
PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN,
TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) États désignés (sauf indication contraire, pour tout titre
de protection régionale disponible) : ARIPO (BW, GH,
GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM,
ZW), eurasién (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM),
européen (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI,
FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, MC, NL, PL, PT, RO,
SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN,
GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Déclaration en vertu de la règle 4.17 :

— relative à la qualité d'inventeur (règle 4.17.iv)) pour US
seulement

Publiée :

— avec rapport de recherche internationale
— avant l'expiration du délai prévu pour la modification des
revendications, sera republiée si des modifications sont re-
çues

En ce qui concerne les codes à deux lettres et autres abrégia-
tions, se référer aux "Notes explicatives relatives aux codes et
abréviations" figurant au début de chaque numéro ordinaire de
la Gazette du PCT.

(54) Title: EXTRAPALLIAL FLUID OF MOLLUSCS, METHOD OF OBTAINING SAME, FORMULATION AND USE
THEREOF

(54) Titre : LIQUIDES EXTRAPALLEAUX DE MOLLUSQUES, OBTENTION, FORMULATION ET UTILISATION

(57) Abstract: The invention relates to a fluid-preparation method comprising the recovery of the fluid that is located between the shell and the body of a mollusc. The invention also relates to the liquid obtained using said method and to the use thereof in the pharmaceutical field, for example, in order to improve cutaneous healing, to regenerate tissues or to promote osteogenesis or bone mineralisation. The invention further relates to compositions, particularly pharmaceutical compositions, medical devices or food supplements containing same.

(57) Abrégé : La présente invention concerne un procédé de préparation d'un liquide comprenant la récupération du liquide se situant entre la coquille et le corps d'un mollusque, le liquide susceptible d'être obtenu par ce procédé, son utilisation dans le domaine pharmaceutique, notamment pour améliorer la cicatrisation cutanée, pour régénérer les tissus, ou pour favoriser l'ostéogénèse ou la minéralisation osseuse. Elle concerne également des compositions, en particulier pharmaceutiques, des dispositifs médicaux ou des compléments alimentaires le contenant.

WO 2005/077388 A1

LIQUIDES EXTRAPALLEAUX DE MOLLUSQUES, OBTENTION,
FORMULATION ET UTILISATION

La présente invention concerne un procédé d'obtention d'un liquide comprenant
5 l'extraction à partir d'un mollusque du liquide se situant entre la coquille et le corps
du mollusque, le liquide susceptible d'être obtenu par ce procédé, son utilisation
dans le domaine pharmaceutique, et notamment pour améliorer la cicatrisation
cutanée, pour régénérer les tissus, ou pour favoriser l'ostéogenèse ou la
10 minéralisation osseuse. Elle concerne également des compositions, en particulier
pharmaceutiques, des dispositifs médicaux ou des compléments alimentaires le
contenant.

Dans de nombreux cas de dégénérescence des tissus minéralisés, la réparation
tissulaire reste un problème complexe non encore résolu, notamment à cause de la
15 difficulté de mettre en œuvre des matériaux de substitution induisant une
régénération. Parmi ces matériaux de substitution induisant une régénération, la
nacre a déjà montré sa biocompatibilité, sa capacité ostéogénique et
ostéoinductrice vis-à-vis des ostéoblastes humains [Lopez et al., Tissue & Cell,
1992 : 667-679 ; Lamghari et al., J. Bone Miner. Res. 2001 ; 16 : 2232-2237].

20

Dans ce cadre, la nacre a permis de proposer des solutions efficaces dans des cas
particuliers. Ainsi, des implants fabriqués à partir de nacre ont été proposés pour
des réparations endo-osseuses. La nacre réduite en poudre a également été
suggérée comme matériau de comblement où elle montre alors des propriétés de
25 biodissolution ; on observe un remplacement progressif par de l'os néoformé
compact et spongieux suivant la nature de l'os receveur.

L'utilisation de la nacre comme biomatériau n'est malheureusement pas toujours aisée ou possible dans de nombreux cas, par exemple lors de larges réparations locales de tissus dégénérés ou de pertes de substances.

- 5 Il n'existe donc pas à ce jour de biomatériau aisément formulable et permettant de régénérer les tissus biologiques ou osseux de manière totalement satisfaisante.

A ce titre, la demanderesse vient de mettre au point une technique d'obtention du fluide extrapalléal se situant entre la coquille et le corps d'un mollusque par
10 extraction dudit fluide (ou liquide). La demanderesse vient de mettre en évidence que le fluide ainsi obtenu peut conserver ses propriétés auto-organisantes et que ces dernières peuvent être utilisées, même dans un contexte externe à l'animal. En outre, ce fluide présente un grand intérêt industriel du fait de sa nature physique, puisqu'il peut se présenter sous de nombreuses formes, comme par exemple sous
15 la forme d'un liquide, d'un film, d'un revêtement, de fibres ou encore sous la forme d'un matériau poreux. Ainsi, il peut facilement être manipulé et utilisé sous différentes formes, tout en gardant ses propriétés biologiques.

La présente invention vise donc un procédé d'obtention d'un fluide extrapalléal
20 comprenant la récupération du fluide extrapalléal se situant entre l'intérieur de la coquille et le corps d'un mollusque, en particulier le manteau dudit mollusque.

Elle a également pour objet le fluide susceptible d'être obtenu par ce procédé et son utilisation dans divers domaines. Le fluide obtenu est ainsi pur et pris dans son
25 intégralité, en particulier non modifié et non transformé, ultérieurement à la récupération, par un procédé modifiant ses qualités intrinsèques. Il peut être par la suite formulé, pour être en particulier utilisé dans une composition pharmaceutique, un dispositif médical ou des compléments alimentaires.

La composition pharmaceutique selon l'invention est en particulier destinée à améliorer les phénomènes de cicatrisation, à régénérer les tissus, biologiques ou osseux, favoriser l'ostéogénèse ou la minéralisation osseuse.

- 5 Chez l'animal, ce liquide participe *in situ* à la minéralisation de l'exosquelette. Certains voient une grande unicité des processus de minéralisation développés par la nature, depuis les exosquelettes des mollusques jusqu'à l'endosquelette des mammifères supérieurs. Le champ d'application de ces bioproduits est donc potentiellement très étendu, dans les domaines squelettiques, os et cartilage, dents,
10 ou tout autre tissu, en particulier la peau et ses phanères.

Selon l'invention, le procédé de préparation d'un liquide comprend donc une étape de récupération du fluide extrapalléal se situant entre la coquille et le corps d'un mollusque, en particulier le manteau dudit mollusque, ledit fluide ayant été extrait à
15 partir d'un mollusque.

Le fluide ainsi récupéré correspond à des sécrétions naturelles du mollusque qui se trouvent à la surface externe du manteau des mollusques du côté de la coquille. De manière surprenante, la demanderesse a constaté que ce liquide, même une fois
20 extrait et donc en dehors de son contexte naturel, pouvait être utilisé pour ses propriétés régénératrices et minéralisantes, et promouvoir ainsi la fabrication de la coquille (matière organominéralisée) d'un mollusque, et de façon plus large se substituer à, ou régénérer, des sécrétions de tout autre tissu connu pour former une matrice extracellulaire. Le liquide présente ainsi l'avantage de régénérer les tissus,
25 biologiques ou osseux, notamment en stimulant l'activité des cellules qui forment lesdits tissus ou en apportant les matériaux de base utiles à ladite régénération, et de favoriser l'ostéogénèse ou la minéralisation osseuse.

Par régénération de tissus, on entend la reconstruction et le renouvellement de tout
30 tissu ayant subi un dommage ou une altération (ou tissu lésé). Par minéralisation

(minéralisateur ou minéralisant), on entend l'action (capacité) qui consiste à apporter des éléments minéraux ou qui favorise la fixation des éléments minéraux sur de la matière organique. Par espèces minérales, on entend les cristaux, les atomes, les ions, les molécules contenant des éléments « minéraux » et/ou oligo-
5 éléments, par opposition aux éléments organiques. Ainsi, la régénération d'un tissu biologique ou osseux consiste généralement à reconstruire ou renouveler en tout ou partie le tissu altéré, notamment grâce aux molécules de structure spécifique, aux molécules « signal » et aux éléments nourriciers organiques et/ou minéraux présents dans le liquide obtenu selon l'invention. En outre, aucune intolérance n'a
10 été détectée lors de l'application du liquide ainsi extrait et/ou modifié ultérieurement sur ou dans un mammifère.

L'étape de prélèvement ou d'extraction du liquide est généralement réalisée de la manière suivante.

15 Le mollusque à partir duquel est extrait le liquide est généralement un mollusque mono- ou bi-valve, nacrier ou non, avantageusement nacrier. Les mollusques sont en particulier des huîtres et plus spécifiquement des huîtres du genre Pinctada et plus particulièrement du genre Pinctada espèce margaritifera ou maxima. Les huîtres peuvent être aussi choisies parmi celles du genre Ostrea, en particulier de
20 l'espèce edulis, ou encore du genre Crassostrea, en particulier de l'espèce gigas. Il peut s'agir également de céphalopodes, comme par exemple le nautilus, ou encore de gastéropodes, comme par exemple le bigorneau.

Le mollusque utilisé peut provenir d'un élevage aquacole ou terrestre. Le mollusque
25 peut être sacrifié avant, pendant ou après le procédé selon l'invention. Il peut être utilisé mort ou vivant. Le mollusque par exemple peut être sacrifié avant le procédé selon l'invention, en prenant garde de conserver au moins partiellement (de préférence totalement) le liquide à extraire dans la coquille.

30 Le prélèvement du fluide extrapalléal peut être réalisé sur des lots de mollusques

exclusivement destinés à cet usage, sans nuire pour autant à leur intégralité. Les mollusques peuvent être éventuellement utilisés par la suite, ceux-ci restant sains et vivants.

- 5 De manière plus spécifique, le procédé ou l'étape d'extraction est une méthode non invasive. En effet, le liquide se situant entre l'intérieur de la coquille et le corps du mollusque, en particulier le manteau dudit mollusque, correspond à des sécrétions naturelles du mollusque qui se trouvent à la surface externe du manteau des mollusques du côté de la coquille et donc qui se trouvent à l'extérieur du corps du
- 10 mollusque proprement dit.

Afin d'accéder au liquide à extraire, le manteau du mollusque est de préférence décollé en tout ou partie. Lorsque le mollusque est bi-valve, au moins une des deux valves est soulevée de manière à pouvoir accéder au corps du mollusque,

15 préalablement à l'extraction.

Le décollement (ou séparation) du liquide de la coquille peut être réalisé manuellement, généralement à l'aide d'un outil approprié (comme par exemple : racloir ou spatule souple). Selon une autre méthode, éventuellement en complément dudit décollement manuel, le décollement du liquide de la coquille est

20 réalisé chimiquement. Ainsi, une réaction enzymatique, avantageusement non dénaturante, et généralement à température ambiante, peut aussi être mise en œuvre de façon à séparer, plus finement, le liquide de la coquille. De préférence, cette réaction enzymatique est réalisée en présence d'au moins une protéase, telle que par exemple la trypsine. La réaction peut ensuite être stoppée par une anti-

25 protéase ou par simple dilution.

Le liquide est alors prélevé à la surface de la coquille à l'aide d'un instrument approprié, notamment à l'aide d'une seringue (en particulier munie d'une aiguille).

Le liquide prélevé est avantageusement stérilisé ou décontaminé par toute méthode connue en soi, notamment par filtration, par exemple sur filtre Millipore® (exemple :

30 0,20µm). Il peut être aussi déshydraté, notamment par lyophilisation. Le liquide peut

également être congelé, de préférence juste après la récupération ou après filtration.

5 Selon une variante du procédé, le prélèvement peut être effectué sur des mollusques vivants, par exemple lorsqu'il s'agit de gros mollusques, comme les bivalves nacriers de la famille des Pinctada.

10 Cette variante consiste de préférence à maintenir la coquille du bivalve vivant ouverte à l'aide d'un instrument, tel qu'une cale et/ou une pince forceps (ou écarteur). L'instrument est de préférence choisi de manière à ne pas blesser l'animal, en particulier il est choisi de manière à ne pas léser de façon irréversible son métabolisme. Le manteau est préférentiellement soulevé en tout ou partie pour le séparer d'au moins de l'une des coquilles.

15 Le liquide est alors prélevé à la surface de la coquille à l'aide d'un instrument approprié, tel que notamment racloir ou spatule souple. Avantagusement, un racloir (en plastique) est utilisé pour récolter le liquide se trouvant entre le manteau et la coquille. Alternativement, la récolte du liquide s'opère à l'aide d'une seringue généralement munie d'une aiguille, de préférence de diamètre compris entre 1 mm et 5 mm. Bien entendu, tout autre matériel adapté à la récolte du liquide peut être
20 envisagé.

Le procédé d'obtention du fluide selon l'invention peut comprendre en outre des étapes ultérieures non dénaturantes du fluide ainsi récupéré, telles que des étapes de filtration, de décontamination, de stérilisation, de congélation/décongélation, de
25 modifications de viscosité, et/ou de mises en formes variées.

Le liquide obtenu selon la méthode décrite ci-dessus peut être utilisé tel que, à l'état pur (pris dans son intégralité), en particulier il est non modifié et non transformé, ultérieurement à la récupération, par un procédé modifiant ses qualités intrinsèques
30 (étapes dénaturantes), notamment par un procédé de déminéralisation.

Le liquide obtenu peut être formulé par la suite en fonction de son usage ultérieur. Ainsi, l'utilisation ultérieure du liquide peut nécessiter un mode de préparation adapté. Les expériences conduites avec le liquide ainsi récupéré montrent qu'il est
5 d'un maniement très souple et qu'il s'adapte très facilement à toutes sortes de contraintes liées à sa mise en oeuvre. Il peut ainsi subir plusieurs décongélations et re-congélations sans que ses propriétés biologiques en soient affectées. Il en est de même pour la lyophilisation. Bien entendu, l'homme du métier veillera à ne pas modifier les qualités intrinsèques du liquide ainsi extrait et évitera donc de faire
10 subir à ce liquide toute opération nuisant à son intérêt, tel qu'une opération de déminéralisation.

Il est également possible de varier la viscosité du liquide ainsi obtenu en modifiant sa concentration en eau. On peut y incorporer un gélifiant ou toute autre substance
15 facilitant son utilisation ultérieure, pour le rendre plus ou moins liquide (visqueux).

Le fluide peut par exemple être mis sous forme de film ou de revêtement. Toute méthode connue en soi pour mettre sous forme de film ou de revêtement un liquide peut être mise en oeuvre. Il peut par exemple être étalé sur une surface lisse ou
20 poreuse ou tout autre support et former un film (caractère filmogène du fluide obtenu). Le film ou revêtement ainsi formé conserve le caractère régénérant et cicatrisant du liquide. Il peut constituer ainsi un film biologique organique en surface, avec un pouvoir minéralisant. L'épaisseur du film peut varier dans une large mesure en fonction de son usage final. Un film épais peut être par exemple
25 obtenu avec la triple propriété : (i) étanchéité, (ii) structure auto-soutenue, (iii) apport minéral intrinsèque, tout en présentant le caractère régénérant et cicatrisant. Ce matériau, constitué par une association intime entre matière organique et matière minérale, forme un film sur toute surface et cristallise de façon polymorphe suivant l'état et la texture de la surface. Le film ainsi obtenu peut être utilisé sur son
30 support ou être retiré du support pour un usage ultérieur.

Le liquide peut aussi être utilisé ultérieurement sous forme de fibres. Toute méthode connue en soi pour mettre sous forme de fibres un liquide peut être mise en oeuvre. Ce liquide présente en effet l'avantage d'être filable dans un domaine large de viscosités. En particulier, une technique très simple d'étirement, notamment à l'aide d'une pince brucelles, permet d'étirer des fibres à partir du liquide. Il est possible de cette manière de l'utiliser *in situ* (localement) ou d'une autre manière, comme matériau de comblement poreux, invasif, pour remplir selon le besoin un volume donné. Le caractère invasif de ce matériau permet notamment à des matériaux biologiques, tels que des cellules, d'y pénétrer et d'y exercer leurs effets en association avec les propriétés du liquide mis en forme. Le même matériau peut être utilisé pour ponter deux berges tissulaires éloignées. Le même principe peut s'appliquer sur de très gros volumes, notamment par enduction de fibres d'une autre nature chimique (par exemple des fibres de carbone). Les fibres ainsi enduites présentent un revêtement à leur surface comprenant les éléments constitutifs du liquide selon l'invention et peuvent être utilisées pour assurer par exemple une interface cicatrisante.

Le fluide peut ainsi se présenter sous différentes formes, incluant liquide, films, revêtements et fibres. Selon la mise en forme désirée, il peut également se présenter sous forme d'un matériau poreux, notamment en utilisant, lors de sa mise en forme, un support poreux. Le matériau poreux peut être un film, un revêtement ou se présenter sous tout autre forme, tel qu'une forme sphérique.

Le fluide selon l'invention comprend généralement un mélange des éléments constitutifs de la matière vivante, en particulier un mélange de protéines, de proteoglycanes, de polysaccharides, de lipides et de sels minéraux, ceci est plus particulièrement le cas pour un mollusque nacrier, avantageusement une huître du genre *Pinctada* (généralement prise dans son biotope naturel). La nature et la quantité de ces éléments peuvent varier dans une large mesure, notamment en

fonction du mollusque, de son biotope, de la saison du prélèvement et des conditions du prélèvement.

Pour donner un ordre de grandeur, ces éléments ont été analysés dans un liquide
5 donné (huître adulte du genre *Pinctada* prise dans son biotope naturel). La composition de ce liquide comprend de préférence au moins les composés suivants : des protéines en quantité moyenne de 0,5 mg/mL, des proteoglycanes en quantité moyenne de 3 mg/mL, des polysaccharides en quantité moyenne de 1,5 mg/mL, des lipides en quantité moyenne de 1mg/mL et des sels minéraux en
10 quantité moyenne de 7,5 mg/mL.

Une analyse quantitative des oligo-éléments présents dans un liquide spécifique (identique à celui identifié ci-dessus) selon l'invention a été réalisée, en particulier en mesurant quantitativement les oligo-éléments présents par analyse par
15 activation neutronique (AAN) et spectrométrie de masse couplée à une torche à plasma (ICP-MS). La composition de ce liquide (directement obtenu : sans déshydratation et modification ultérieure) comprend de préférence les oligo-éléments choisis parmi : S, Mg, La, Zn, Br, Ce, Fe, Mn, Cl, Cu, K, Sr, Na et Ca. De préférence, les quantités de ces oligo-éléments sont respectivement les suivantes :
20 0,02 ; 2 ; 0,28 ; 0,4 ; 1,78 ; 5,5 ; 13,6 ; 50 ; 296 ; 143 ; 582 ; 1000 ; 5420 (exprimés en µg/g) et 38,8 (exprimés en µg/100g).

Une analyse quantitative des acides aminés présents sous forme libre ou lié dans un fluide selon l'invention a été réalisée, en particulier en mesurant quantitativement
25 les acides aminés présents par l'analyseur d'acides aminés Beckmann 6300 utilisant la méthode classique à la ninhydrine. Le résultat de cette analyse est donné à la figure 1 (% en poids d'acides aminés par rapport au poids total d'acides aminés).

30 La présente invention a aussi pour objet le fluide susceptible d'être obtenu par le

procédé tel que décrit-avant. Le liquide (ou fluide) peut être non seulement le liquide obtenu directement après l'étape de récupération décrite ci-dessus, mais aussi celui obtenu après des étapes ultérieures non dénaturantes, telles que des étapes de filtration, de décontamination, de stérilisation, de congélation/décongélation, de modifications de viscosité, et/ou de mises en formes variées, telles que notamment
5 celles identifiées ci-dessus.

Plus particulièrement, le fluide selon l'invention est utilisé à titre de médicament.

- 10 La présente invention a également pour objet une composition, en particulier pharmaceutique, caractérisée en ce qu'elle comprend le fluide tel que défini ci-dessus, en particulier en association avec un excipient pharmaceutiquement acceptable.
- 15 Le liquide utilisé à titre de médicament ou dans la composition détaillée ci-dessus peut être celui obtenu directement après l'étape de récupération décrite ci-dessus, mais aussi celui obtenu après des étapes ultérieures de filtration, de décontamination, de stérilisation, de congélation/décongélation, de modifications de viscosité, et/ou de mises en formes variées, telles que notamment celles identifiées
20 ci-dessus.

L'administration de la composition pharmaceutique ou du médicament selon l'invention peut être effectuée par voie topique, entérale ou parentérale. De préférence, la composition pharmaceutique est conditionnée sous une forme
25 convenant à une application par voie topique, c'est à dire appliquée *in situ* à l'endroit où le tissu est lésé.

Par voie entérale, la composition pharmaceutique peut se présenter sous forme de comprimés, de gélules, de dragées, de sirops, de suspensions, de solutions, de
30 poudres, de granulés, d'émulsions, de microsphères ou nano-sphères ou vésicules

lipidiques ou polymériques permettant une libération contrôlée. Par voie parentérale, la composition peut se présenter sous forme de solutions ou suspensions pour perfusion ou pour injection.

- 5 Selon un mode particulier de l'invention, la composition pharmaceutique est destinée à un usage local sur ou dans le tissu lésé. Ainsi, le support pharmaceutiquement acceptable est en particulier un excipient approprié à une application topique.

- Par voie topique, la composition pharmaceutique selon l'invention est plus particulièrement destinée au traitement des tissus mentionnés ci-dessus, en
10 particulier au traitement de la peau et des os d'un mammifère, en particulier humain. Elle peut se présenter sous forme d'onguents, de crèmes, de laits, de pommades, de poudres, de tampons imbibés, de solutions, de gels, de sprays, de lotions ou de suspensions. Elle peut également se présenter sous forme de
15 microsphères ou nano-sphères ou vésicules lipidiques ou polymériques ou de patches polymériques et d'hydrogels permettant une libération contrôlée. Cette composition par voie topique peut se présenter sous forme anhydre, sous forme aqueuse ou sous la forme d'une émulsion (émulsion eau/huile, huile/eau ou émulsion multiple).

20

Le liquide selon l'invention est utilisé, de préférence par voie topique, à une concentration généralement comprise entre 0,02 % et 20 % en poids, de préférence entre 0,25 et 10 % en poids, et avantageusement entre 0,5 et 5 %, par rapport au poids total de la composition.

25

- En particulier, la composition thérapeutique selon l'invention est caractérisée en ce qu'elle contient, en association avec des excipients inertes, une quantité thérapeutiquement efficace du liquide selon l'invention, notamment pour améliorer la cicatrisation cutanée, pour régénérer les tissus, ou pour favoriser l'ostéogenèse
30 ou la minéralisation osseuse. Les tissus comprennent les tissus mous ou

squelettiques, incluant en particulier le squelette, les os, le cartilage, les dents, ou tout autre tissu, en particulier la peau et ses phanères. La composition selon l'invention permet de traiter en particulier les désordres osseux, cartilagineux ou dentaires.

5

L'invention réside également dans une méthode pour améliorer la cicatrisation cutanée, pour régénérer les tissus, notamment ceux identifiés ci-dessus, ou pour favoriser l'ostéogenèse ou la minéralisation osseuse, comprenant l'administration à des sujets nécessitant d'un tel traitement d'une quantité thérapeutiquement efficace

10 du liquide tel que défini précédemment.

Dans le contexte de l'invention, le terme « traitement » désigne le traitement préventif, curatif, palliatif, ainsi que la prise en charge des patients (réduction de la douleur, amélioration de la qualité de vie, ralentissement de la progression du

15 désordre, du traumatisme ou de la maladie), etc.

La méthode ou le traitement peut en outre être réalisé en combinaison avec d'autres ingrédients ou traitements, tels que notamment d'autres composés actifs pour améliorer la cicatrisation cutanée, pour régénérer les tissus, ou pour favoriser

20 l'ostéogenèse ou la minéralisation osseuse.

Les compositions pharmaceutiques ou médicaments selon l'invention peuvent comprendre en outre au moins un autre ingrédient thérapeutiquement actif, pour une utilisation simultanée, séparée ou étalée dans le temps.

25

Les compositions pharmaceutiques ou médicaments selon l'invention comprennent avantageusement un ou plusieurs excipients ou véhicules inertes, c'est à dire pharmaceutiquement inactifs et non toxiques. On peut citer par exemple des solutions salines, physiologiques, isotoniques, tamponnées, etc., compatibles avec

30 un usage pharmaceutique et connues de l'homme du métier. Les compositions

peuvent contenir un ou plusieurs agents ou véhicules choisis parmi les dispersants, solubilisants, stabilisants, conservateurs, etc. Des agents ou véhicules utilisables dans des formulations (liquides et/ou injectables et/ou solides) sont notamment la méthylcellulose, l'hydroxyméthylcellulose, la carboxyméthylcellulose, les cyclodextrines, le polysorbate 80, le mannitol, la gélatine, le lactose, des huiles végétales ou animales, l'acacia, etc. Les compositions peuvent être formulées sous forme de suspension injectable, de gels, huiles, comprimés, suppositoires, poudres, gélules, capsules, etc., éventuellement au moyen de formes galéniques ou de dispositifs assurant une libération prolongée et/ou retardée. Pour ce type de formulation, on utilise avantageusement au moins un agent tel que la cellulose, des carbonates ou des amidons.

Les compositions telles que décrites précédemment peuvent bien entendu en outre contenir des additifs pharmacodynamiquement actifs ou une combinaison de ces additifs, et notamment : des agents mouillants, des émoullients, des agents hydratants, comme le glycérol, le PEG 400 ou bien encore l'urée.

Ces compositions peuvent également contenir des agents d'amélioration de la saveur, des agents conservateurs tels que les esters de l'acide parahydroxybenzoïque, les agents stabilisants, des agents régulateurs d'humidité, des agents régulateurs de pH, des agents modificateurs de pression osmotique, des agents émulsionnants, des antioxydants, tels que l' α -tocophérol, le butylhydroxyanisole ou le butylhydroxytoluène.

Bien entendu, l'homme du métier veillera à choisir le ou les éventuels composés à ajouter à ces compositions de telle manière que les propriétés avantageuses attachées intrinsèquement à la présente invention ne soient pas ou substantiellement pas altérées par l'addition envisagée.

L'administration peut être réalisée par toute méthode connue de l'homme du métier,

notamment par voie orale, topique ou par injection, typiquement par voie intra-péritonéale, intra-cérébrale, intra-thécale, intra-veineuse, intra-artérielle ou intramusculaire. L'administration par voie topique ou orale est préférée. S'agissant d'un traitement à long terme et non topique, la voie d'administration préférée sera
5 sublinguale, orale ou transcutanée.

Pour les injections, les composés sont généralement conditionnés sous forme de suspensions liquides, qui peuvent être injectées au moyen de seringues ou de perfusions, par exemple. Il est entendu que le débit et/ou la dose injectée, ou de
10 manière générale la dose à administrer, peuvent être adaptés par l'homme du métier en fonction du sujet à traiter, du désordre, du mode d'administration, etc.. Il est entendu que des administrations répétées peuvent être réalisées, éventuellement en combinaison avec d'autres ingrédients actifs ou tout véhicule acceptable sur le plan pharmaceutique (tampons, solutions saline, isotonique, en
15 présence d'agents stabilisants, etc.).

Selon un aspect particulier, l'invention concerne un dispositif, plus spécifiquement adapté à une injection sous-cutanée ou percutanée, comprenant le liquide tel que défini ci-avant et un excipient ou support physiologiquement acceptable. Ce
20 dispositif peut notamment être sous forme de seringues ou de perfusions.

Selon une variante, le dispositif médical de la présente invention peut être destiné à être implanté dans ou sur le corps d'un mammifère, le liquide tel que défini ci-avant pouvant se situer à l'intérieur d'une membrane adaptée à cette usage.

25 Selon un autre aspect particulier, l'invention concerne un complément alimentaire comprenant le liquide tel que défini ci-avant. Ce complément alimentaire est en particulier destiné à améliorer la cicatrisation cutanée, à régénérer les tissus, ou à favoriser l'ostéogenèse ou la minéralisation des os ou de la denture.

30 L'invention est utilisable chez les mammifères, en particulier chez l'être humain.

D'autres aspects et avantages de la présente invention apparaîtront à la lecture des exemples qui suivent, qui doivent être considérés comme illustratifs et non limitatifs.

5 **EXEMPLES**

Exemple 1. Récupération du liquide à partir d'un animal sacrifié

Le mollusque est sacrifié de manière à ce que le liquide reste dans la coquille. On décolle avec précaution le manteau ; on utilise ensuite une réaction enzymatique
10 pour décoller complètement le liquide de la coquille. La réaction est ensuite stoppée par une anti-protéase. Le liquide est ensuite prélevé à la surface de la coquille. Aussitôt prélevé, le liquide peut être congelé. Il peut être stérilisé par filtration sur millipore 0, 20µm et être lyophilisé tout en conservant ses propriétés.

15 Exemple 2. Récupération du liquide à partir d'un animal vivant

Une huître de l'espèce de *Pinctada margaritifera* est entre-ouverte grâce à un écarteur suivant les pratiques bien connues de l'homme de l'art en perliculture. L'eau en excès encore présente est évacuée. L'animal est disposé de façon horizontale. Le manteau est délicatement séparé de la coquille inférieure à l'aide
20 d'une pince, puis le liquide est prélevé à l'aide d'une seringue, par exemple.

Pour le groupe 1 : taille moyenne: 77mm épaisseur moyenne : 26,12mm, on obtient 200 à 300 µL de liquide prélevé.

25 Pour le groupe 2 : taille moyenne: 85,2mm épaisseur moyenne : 25,6mm, on obtient 300 à 500 µL de liquide prélevé.

Pour le groupe 3 : taille moyenne: 104mm épaisseur moyenne : 36,9mm, on obtient 500 à 800 µL de liquide prélevé.

Pour le groupe 4 : taille moyenne: 108,6mm épaisseur moyenne : 36mm, on obtient 800 à 1000 µL de liquide prélevé.

Le liquide est :

- 5 - filtré
- lyophilisé
- quelques semaines plus tard, le liquide est reformé avec de l'eau stérile
- il est étalé sous forme de film épais.

10

Exemple 3. Récupération du liquide à partir d'un mollusque non nacrier

Une huître de l'espèce *Ostrea edulis* est sacrifiée. Sa coquille est ouverte par cisaillement du muscle sans séparer les valves (par exemple à 60° l'une de l'autre). L'huître est fixée et le manteau est décollé. De cette manière, il est possible de

15 récolter le liquide de la première valve. L'animal est ensuite retourné pour opérer sur l'autre face. Dans ce cas, une quantité de 50 à 100µl par valve est obtenue.

Le liquide récolté sur une population d'une vingtaine d'animaux subit un conditionnement similaire à celui de l'exemple 2.

20 Le liquide est :

- filtré
- lyophilisé
- quelques semaines plus tard, le liquide est reformé avec de l'eau stérile
- il est étalé sous forme de film épais

25

On constate que le liquide se reconstitue même après lyophilisation, qu'il forme un film sur un support de polypropylène. Ce film se solidifie par auto-organisation et auto-cicatrisation.

L'examen au microscope optique montre qu'il est composé d'une fraction organique

30 et d'une fraction minérale.

REVENDICATIONS

5

1. Procédé d'obtention d'un fluide extrapalléal, caractérisé en ce qu'il comprend la récupération du fluide extrapalléal se situant entre la coquille et le corps d'un mollusque, en particulier le manteau dudit mollusque.

10

2. Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que le mollusque à partir duquel est récupéré le fluide est un mollusque bivalve, avantageusement nacrier.

15

3. Procédé selon la revendication 2, caractérisé en ce que le mollusque est choisi parmi des huîtres et plus spécifiquement des huîtres du genre *Pinctada* et plus particulièrement de l'espèce *margaritifera* ou *maxima*, du genre *Ostrea*, en particulier de l'espèce *edulis*, ou du genre *Crassostrea*, en particulier de l'espèce *gigas*.

20

4. Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que le mollusque à partir duquel est récupéré le fluide est un céphalopode, comme par exemple le nautilus, ou encore un gastéropode, comme par exemple le bigorneau.

25

5. Procédé selon l'une des revendications précédentes, caractérisé en ce que, préalablement à la récupération, le manteau du mollusque est décollé en tout ou partie.

30

6. Procédé selon l'une des revendications précédentes, caractérisé en ce que, préalablement à la récupération, lorsque le mollusque est bi-valve, au moins une des deux valves est soulevée de manière à pouvoir accéder au corps du mollusque.

7. Procédé selon l'une des revendications précédentes, caractérisé en ce que, préalablement à la récupération, le décollement du fluide extrapalléal de la coquille est réalisé manuellement, généralement à l'aide d'un outil approprié.

5 8. Procédé selon l'une des revendications précédentes, caractérisé en ce que le fluide extrapalléal est récupéré à la surface de la coquille à l'aide d'un instrument approprié, tel que notamment racloir, spatule ou seringue.

10 9. Procédé selon l'une des revendications précédentes, caractérisé en ce qu'il comprend en outre des étapes non dénaturantes du fluide ainsi récupéré, en particulier une ou des étapes de filtration, de décontamination, de stérilisation, de congélation/décongélation, de modifications de viscosité, et/ou de mises en formes variées.

15 10. Procédé selon l'une des revendications précédentes, caractérisé en ce que le fluide récupéré est stérilisé ou décontaminé.

20 11. Procédé selon l'une des revendications précédentes, caractérisé en ce que le fluide récupéré est déshydraté, notamment par lyophilisation.

12. Procédé selon l'une des revendications précédentes, caractérisé en ce que le fluide récupéré est congelé, de préférence juste après la récupération ou après filtration.

25 13. Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce que le fluide récupéré est mis sous forme de film ou de revêtement.

30 14. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 12, caractérisé en ce que le fluide récupéré est mis sous forme de fibres.

15. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 12, caractérisé en ce que le fluide récupéré est mis sous forme d'un matériau poreux.

5 16. Fluide susceptible d'être obtenu par le procédé tel que défini dans l'une quelconque des revendications précédentes.

10 17. Composition pharmaceutique, caractérisée en ce qu'elle comprend le fluide défini dans la revendication précédente et un excipient pharmaceutiquement acceptable.

18. Composition selon la revendication précédente, destinée à améliorer la cicatrisation cutanée, à régénérer les tissus mous ou squelettiques, ou à favoriser l'ostéogénèse ou la minéralisation osseuse.

15 19. Composition selon la revendication 17, destinée au traitement des désordres osseux, cartilagineux ou dentaires.

20 20. Composition pharmaceutique selon l'une des revendications précédentes 17 à 19, caractérisée en ce que le support pharmaceutiquement acceptable est un excipient approprié à une application topique, entérale ou parentérale.

25 21. Composition selon la revendication précédente, caractérisée en ce que le support pharmaceutiquement acceptable est un excipient approprié à une application topique.

30 22. Composition selon l'une quelconque des revendications précédentes 17 à 21, caractérisée en ce qu'elle comprend en outre au moins un autre ingrédient thérapeutiquement actif pour une utilisation simultanée, séparée ou étalée dans le temps.

23. Fluide selon la revendication 16, à titre de médicament.

24. Dispositif comprenant le fluide tel que défini dans la revendication 16 et un excipient ou support physiologiquement acceptable.

5

25. Dispositif selon la revendication précédente, caractérisé en ce que sa forme est adaptée à une injection sous-cutanée ou percutanée, en particulier sous forme de seringue ou de perfusion.

10 26. Dispositif selon la revendication 24, caractérisé en ce que le fluide est à l'intérieur d'une membrane.

27. Complément alimentaire comprenant le fluide tel que défini à la revendication 16.

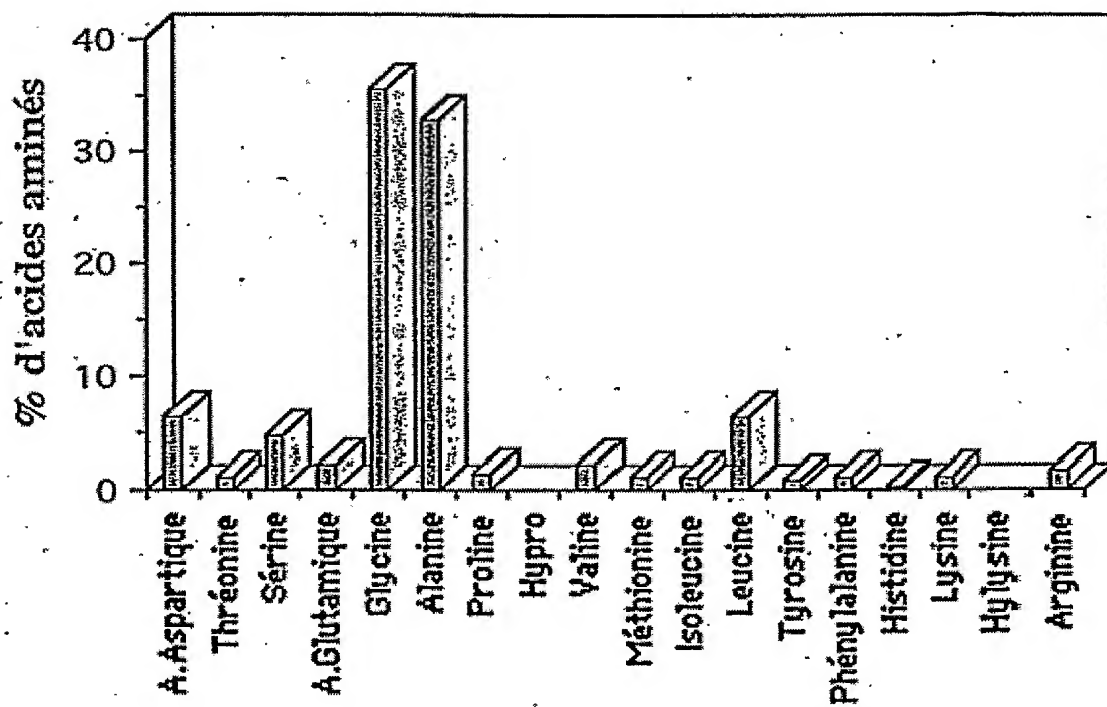


FIGURE 1

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

 International Application No
 PCT/FR2005/000344

 A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
 IPC 7 A61K35/56

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data, PAJ, BIOSIS, EMBASE, MEDLINE

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	FR 2 713 482 A (CAMPRASSE SERGE; CAMPRASSE GEORGES) 16 June 1995 (1995-06-16) page 1, line 22 - page 2, line 23; claims 1-5	1-27
X	FR 2 502 007 A (SIMONIN RENEE) 24 September 1982 (1982-09-24) page 1, line 27 - line 34; claims 1-3 page 2, line 33 - page 3, line 14	1-27
A	FR 2 743 075 A (CENTRE NAT RECH SCIENT) 4 July 1997 (1997-07-04) the whole document	1-27
A	FR 2 595 247 A (SEDERMA SA) 11 September 1987 (1987-09-11) the whole document	1-27

☐ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- *G* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

7 June 2005

Date of mailing of the international search report

14/06/2005

Name and mailing address of the ISA

 European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
 NL - 2280 HV Rijswijk
 Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
 Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Bochenen, D

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/FR2005/000344

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
FR 2713482	A	16-06-1995	FR 2713482 A1	16-06-1995
			AU 1245895 A	27-06-1995
			DE 69431103 D1	05-09-2002
			DE 69431103 T2	08-05-2003
			EP 0683681 A1	29-11-1995
			WO 9515774 A1	15-06-1995
			PT 683681 T	31-12-2002
FR 2502007	A	24-09-1982	FR 2502007 A1	24-09-1982
FR 2743075	A	04-07-1997	FR 2743075 A1	04-07-1997
			AT 214284 T	15-03-2002
			AU 1381697 A	28-07-1997
			CA 2254791 A1	10-07-1997
			DE 69619860 D1	18-04-2002
			DE 69619860 T2	07-11-2002
			EP 0869805 A1	14-10-1998
			WO 9724133 A1	10-07-1997
			JP 2000504314 T	11-04-2000
			US 6251438 B1	26-06-2001
FR 2595247	A	11-09-1987	FR 2595247 A1	11-09-1987

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Dev. de Internationale No

PCT/FR2005/000344

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE CIB 7 A61K35/56		
Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB		
B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE		
Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement) CIB 7 A61K		
Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche		
Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si réalisable, termes de recherche utilisés) EPO-Internal, WPI Data, PAJ, BIOSIS, EMBASE, MEDLINE		
C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie °	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	FR 2 713 482 A (CAMPRASSE SERGE; CAMPRASSE GEORGES) 16 juin 1995 (1995-06-16) page 1, ligne 22 – page 2, ligne 23; revendications 1-5	1-27
X	FR 2 502 007 A (SIMONIN RENEE) 24 septembre 1982 (1982-09-24) page 1, ligne 27 – ligne 34; revendications 1-3 page 2, ligne 33 – page 3, ligne 14	1-27
A	FR 2 743 075 A (CENTRE NAT RECH SCIENT) 4 juillet 1997 (1997-07-04) le document en entier	1-27
A	FR 2 595 247 A (SEDERMA SA) 11 septembre 1987 (1987-09-11) le document en entier	1-27
<div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <input type="checkbox"/> Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents <input checked="" type="checkbox"/> Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe </div>		
° Catégories spéciales de documents cités: <div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <div style="width: 48%;"> <p>*A* document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent</p> <p>*E* document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date</p> <p>*L* document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)</p> <p>*O* document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens</p> <p>*P* document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée</p> </div> <div style="width: 48%;"> <p>*T* document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention</p> <p>*X* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément</p> <p>*Y* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier</p> <p>*&* document qui fait partie de la même famille de brevets</p> </div> </div>		
Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée		Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale
7 juin 2005		14/06/2005
Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale		Fonctionnaire autorisé
Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL – 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Bochelen, D

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Demande Internationale No

PCT/FR2005/000344

Document brevet cité au rapport de recherche		Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
FR 2713482	A	16-06-1995	FR 2713482 A1	16-06-1995
			AU 1245895 A	27-06-1995
			DE 69431103 D1	05-09-2002
			DE 69431103 T2	08-05-2003
			EP 0683681 A1	29-11-1995
			WO 9515774 A1	15-06-1995
			PT 683681 T	31-12-2002
FR 2502007	A	24-09-1982	FR 2502007 A1	24-09-1982
FR 2743075	A	04-07-1997	FR 2743075 A1	04-07-1997
			AT 214284 T	15-03-2002
			AU 1381697 A	28-07-1997
			CA 2254791 A1	10-07-1997
			DE 69619860 D1	18-04-2002
			DE 69619860 T2	07-11-2002
			EP 0869805 A1	14-10-1998
			WO 9724133 A1	10-07-1997
			JP 2000504314 T	11-04-2000
			US 6251438 B1	26-06-2001
FR 2595247	A	11-09-1987	FR 2595247 A1	11-09-1987